

Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado

Rodrigo Freitas
BITTENCOURT¹
Antônio de Lisboa RIBEIRO
FILHO²
Marcos Chalhoub Coelho
LIMA²
Sidney Gonçalves Gonzalez
ALVES²
Marta Freitas
VASCONCELOS³
Carmo Emanuel BISCARDE¹
Luciana da Silva LEAL¹
Eunice OBA¹

Correspondências para:

Rodrigo F. Bittencourt - Departamento de
Reprodução Animal e Radiologia,
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia –UNESP, Botucatu-SP, 18618-
000, Brasil. Tel: (55) (14) 38116249. E-
mail: rfbvet@yahoo.com.br

Recebido para publicação: 20/06/2006
Aprovado para publicação: 24/04/2008

1-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual
Paulista, Botucatu-SP
2-Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia,
Salvador-BA
3-Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília-DF

Resumo

Nove amostras de sêmen de dois caprinos adultos, colhidas com a utilização de vagina artificial, foram submetidas a criopreservação, com o objetivo de verificar o efeito do Equex STM Paste e do EDTA, adicionados a um diluidor a base de Tris-gema de ovo, sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento. Também foi objetivo desse trabalho, avaliar a utilização de um diluidor comercial, a base de lecitina de soja (Bioexcell® - IMV, L'Aigle, França), para a congelamento do sêmen caprino. Assim, foram formados cinco grupos experimentais: TRIS; TRIS+EDTA; TRIS+EQUEX; TRIS+EQUEX+EDTA e Bioexcell. Logo depois da avaliação, o sêmen foi diluído nos diferentes meios e envasado em palhetas de 0,25 mL, com dose inseminante de 100×10^6 espermatozoides. As amostras foram submetidas ao resfriamento, com uma curva média de $0,46^\circ\text{C}/\text{min}$, até atingirem a temperatura de 5°C , mantidas por mais 75min em tempo de equilíbrio e, posteriormente, congeladas em nitrogênio líquido. A descongelamento foi realizada em banho-maria a 37°C por 50s. Não houve diferença ($P>0,05$) entre as médias de motilidade total e progressiva, em relação aos grupos TRIS, TRIS+EQUEX e TRIS+EQUEX+EDTA. O grupo Bioexcell obteve o menor ($P<0,05$) percentual de espermatozoides com motilidade total e progressiva após a descongelamento. Após o teste de termoresistência, as melhores ($P<0,05$) taxas de motilidade total e progressiva foram observadas para os grupos com Equex STM (TRIS+EQUEX e TRIS+EQUEX+EDTA). Assim, pode-se afirmar que a adição do Equex promove uma maior manutenção das taxas de viabilidade espermática após a descongelamento, quando comparado com os diluidores que não o continham.

Palavras-chaves:

Caprinos.
Sêmen.
Criopreservação.
Diluidor.

Introdução

A criopreservação do sêmen promove uma elevação dos níveis de cálcio intracelular.¹ Esse aumento resulta em disfunção e morte celular.^{1,2} Assim, visando minimizar o efeito deletério do cálcio durante o processo de congelamento, a partir da década de 1970 alguns pesquisadores passaram a empregar o etileno-diamino-tetra-acetato-dissódico (EDTA) em meios diluidores para

a congelamento de sêmen equino.³ Sua principal função seria quelar o cálcio no meio extracelular, diminuindo seu influxo para o meio intracelular⁴, inibindo, assim, o efeito deletério do cálcio sobre os espermatozoides².

Em estudo com bovinos e bubalinos observou-se uma superioridade de 10-12% na taxa de motilidade espermática pós-descongelamento com o diluidor que continha 0,1% de EDTA em sua composição, em

relação ao diluidor que não o continha.⁵ Resultados semelhantes foram verificados na espécie caprina, cuja motilidade espermática na descongelação foi 10% superior no diluidor com o EDTA (0,1%) em sua composição.⁶

Alguns trabalhos têm demonstrado que a introdução de substâncias detergentes ao meio de congelação, como o Equex STM Paste (Nova Chemical Sales, Scituate Inc., MA, EUA), que tem como princípio ativo o dodecil-sulfato de sódio (DSS), tem melhorado os índices qualitativos, a sobrevivência, longevidade e fertilidade dos espermatozoides pós-descongelação.^{7,8,9} A função do DSS é aumentar a solubilidade dos fosfolipídios da gema de ovo, melhorando a disponibilidade e, assim, a sua capacidade de proteção à membrana plasmática dos espermatozoides contra o choque térmico e as alterações promovidas pelo processo de criopreservação.¹⁰

O Equex STM foi testado por Maia et al.⁷ no diluidor de congelação do sêmen ovino. Os autores compararam a congelabilidade do sêmen ovino em um diluidor a base de Tris-gema de ovo com 0%, 0,5% e com 1% de Equex STM. Esse estudo demonstrou que a adição do Equex aumentou ($P < 0,05$) a motilidade total e progressiva dos espermatozoides em relação ao meio sem detergente. No diluidor Tris a motilidade total e progressiva foi de 34% e 24%, respectivamente, enquanto que no meio Tris com 0,5% de Equex essas foram de 65% e 39% e no Tris com 1% foram 70% e 39%, o que demonstra o efeito benéfico da utilização do detergente na congelação do sêmen ovino.

Os diluidores comumente utilizados para a congelação do sêmen caprino são a base dos aditivos de origem animal, como gema de ovo e/ou leite. Diversas formulações de meios contendo esses compostos têm sido estudadas para a congelação de sêmen dessa espécie como: tris-gema de ovo e gema de ovo-leite¹¹ o leite desnatado de vaca, em pó e reconstituído, citrato de sódio-glicose-gema de ovo, sacarose-EDTA, CaNa_2 -gema de

ovo, rafinose-gema de ovo, Spermasol-gema de ovo, test-gema de ovo¹², maltose-gema de ovo¹³, ácido cítrico-frutose-gema de ovo, com ou sem tris¹⁴, citrato-frutose-gema de ovo¹⁵, leite de cabra¹⁶, água de coco-gema de ovo¹⁷.

Apesar dos bons índices de fertilidade observados em estudos que utilizaram sêmen congelado em meio contendo gema de ovo e/ou leite^{11,18}, estes componentes podem representar um risco potencial para a contaminação do diluidor, caso certos contaminantes (microbianos ou outros) estejam no produto *in natura*¹⁹. De fato, Bousseau et al.¹⁹ ao realizarem análises microbiológicas em dois diluidores de congelação de sêmen comerciais, adicionados de gema de ovo ou esta associada ao leite, demonstraram que todas as amostras estudadas ($n=17$), mesmo na presença de associações de antibióticos de larga ação (penicilina, estreptomicina, lincomicina, espectinomicina ou gentamicina, tilosina, lincomicina e espectinomicina) encontravam-se com contaminação moderada (10-60 CFU/mL) de agentes bacterianos ou destes associados à mycoplasma. Este fator associado a falta de padronização desses aditivos, que podem apresentar grande variação nas suas composições²⁰ estimularam o desenvolvimento de diluidores comerciais formulados a base de lecitina de soja, como uma alternativa à utilização da gema de ovo e do leite (Biociphos® and Bioexcell®, IMV, L'Aigle, France) e com índices de fertilidade semelhantes àqueles do sêmen de bovinos e ovinos criopreservados com os meios convencionais^{21, 22}. Dessa forma, os diluidores sem os componentes de origem animal podem ser uma alternativa segura, quando o sêmen congelado for utilizado para a introdução de um novo material genético em um rebanho ou em um país.²⁰

Mesmo com bons resultados obtidos com a utilização do Equex STM Paste e do diluidor comercial Bioexcell®, para a criopreservação do sêmen de outras espécies, nenhuma citação foi encontrada para a espécie caprina. Assim, este estudo teve como objetivos avaliar o efeito da associação do

Equex STM e do EDTA à um diluidor a base de Tris-gema de ovo e compará-lo à eficácia de um diluidor comercial, a base de lecitina de soja (Bioexcell®) e sem aditivos de origem animal, na congelação do sêmen caprino.

Material e Método

Preparo dos diluidores

A solução de Tris-gema de ovo-glicerol²³ foi o diluidor base utilizado neste trabalho. Todos os reagentes químicos que o compuseram (2,42g de Tris, 1,5g de ácido cítrico, 1,25g de glicose e 6% de glicerol) exceto o sulfato de gentamicina (13,4 mg) (Schering-Plough S/A, São Paulo-SP, Brasil), foram fabricadas pelo laboratório VETEC Ltda (Duque de Caxias-RJ, Brasil), bem como o EDTA. Para o desenvolvimento do experimento foram formados cinco grupos experimentais: Grupo 1- TRIS; Grupo 2- TRIS+EDTA; Grupo 3- TRIS+EQUEx; Grupo 4- TRIS + EQUEx+ EDTA e Grupo 5- Bioexcell.

Aos diluidores TRIS+EDTA e TRIS+EQUEx+EDTA foi adicionado 0,1% de EDTA e aos grupos TRIS+EQUEx e TRIS+EQUEx+EDTA foi acrescentado 0,5% de Equex STM (Nova Chemical Sales, Inc., MA, EUA). O diluidor comercial Bioexcell® (IMV, L'Aigle, França), a base de lecitina de soja, compôs o último protocolo experimental.

Processamento do sêmen

Nove amostras de sêmen de dois caprinos adultos, selecionados após a avaliação clínica e exame andrológico, foram utilizadas nesse experimento. Logo após as colheitas por vagina artificial, realizadas em dias alternados, o sêmen de cada reprodutor era encaminhado ao laboratório de processamento, mantido em banho-maria à temperatura de 35°C e avaliado quanto ao volume, cor, aspecto, motilidade total e progressiva, vigor, turbilhonamento e concentração. Também foram retiradas alíquotas do sêmen para avaliação dos defeitos espermáticos através de

microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x. Após as avaliações iniciais e cálculo da concentração espermática, um total de 400×10^6 de espermatozoides com motilidade progressiva eram adicionados a tubos pré-aquecidos contendo 1mL de cada um dos cinco diluidores, já com o percentual final de glicerol (diluição em uma etapa), compondo quatro doses inseminantes de 100×10^6 de espermatozoides com motilidade progressiva/0,25mL, para cada grupo experimental. Após a diluição nos diferentes meios, o sêmen foi novamente avaliado, envasado em palhetas de 0,25mL e resfriado até 5°C em câmara refrigerada com temperatura estabilizada, a uma taxa de resfriamento médio de 0,46°C/min, previamente controlada através de um termômetro digital de haste fina. Depois de 75min de equilíbrio à temperatura de 5°C, a congelação foi efetuada mantendo-se as palhetas por 20min em vapor de nitrogênio líquido e posteriormente mergulhadas no nitrogênio líquido. As amostras foram descongeladas em banho-maria à 37°C por 50 segundos, cinco dias depois da congelação.

Avaliação do sêmen após a descongelação e teste de termoresistência

Logo após a descongelação as amostras foram avaliadas quanto a motilidade total, progressiva, vigor espermático e submetidas ao teste de termoresistência (TTR), conforme descrito pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).²⁴ O sêmen descongelado também foi avaliado quanto ao percentual de defeitos espermáticos presentes em 200 células, utilizando para tanto a microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x e a classificação espermática preconizada pelo CBRA.²⁴

Delineamento e análise estatística

Cada reprodutor foi considerado um bloco e o delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, no qual os ejaculados foram considerados repetições e

os protocolos de processamento do sêmen foram considerados tratamentos. Os cálculos de média, desvio-padrão e análise de variância foram realizados conforme Sampaio²⁵. Para análise estatística das características avaliadas foi empregado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS) – versão 5.0²⁶, com a seguinte sequência de análises:

1- A consistência dos dados e a análise descritiva (médias e desvio-padrão) das características de interesse ao estudo foram realizadas mediante o emprego do Procedimento MEANS.

2- As variáveis (defeitos maiores, defeitos menores, defeitos de acrossoma e defeitos totais; motilidade espermática total e progressiva e vigor espermático) foram comparadas entre os tratamentos por meio do Procedimento GLM, utilizando-se o teste de Student Newman Keuls (SNK) com o nível de significância de 5%.

Resultados

Os ejaculados utilizados neste estudo tiveram como características um volume total de $0,57 \pm 0,20$ e concentração espermática de $5,25 \pm 1,76 \times 10^9$ espermatozoides/mL. Como se pode observar na tabela 1, o processo de criopreservação afetou significativamente ($P < 0,05$) as taxas de motilidade espermática total e progressiva em todos os diluidores testados, em relação ao sêmen fresco. Contudo, não foi verificada diferença significativa entre o vigor do sêmen fresco e nos diluidores TRIS, TRIS+EQUEx e TRIS+EQUEx+EDTA, logo após a descongelação.

Em geral, todos os diluidores, exceto o Bioexcell, apresentaram valores médios de motilidade progressiva e vigor, acima dos valores mínimos recomendados para o sêmen caprino descongelado, de 30% para motilidade progressiva e 2 para vigor, segundo normas do CBRA²⁴, resultados esses que se repetiram após o teste de termoresistência (TTR) (Tabela 2).

Pode-se verificar também que após

o TTR os diluidores que continham o Equex STM (TRIS+EQUEx e TRIS+EQUEx+EDTA) obtiveram valores médios para a motilidade total e progressiva, semelhantes entre si ($P > 0,05$) e superiores ($P < 0,05$) em relação a todos os demais grupos experimentais, e o Bioexcell proporcionou os resultados mais inferiores ($P < 0,05$) tanto na descongelação, como após o TTR, para os parâmetros MT, MP e VIGOR (Tabelas 1 e 2).

As médias de defeitos menores, defeitos maiores e defeitos totais, observados para a maioria dos diluidores estudados (Tabela 3), estiveram abaixo dos valores máximos recomendados pelo CBRA²⁴ para o sêmen caprino descongelado, de 20% para o número de defeitos totais e 10% de defeitos maiores. Apenas o grupo TRIS superou a média de defeitos totais (20,55%).

Apesar das diferenças nos percentuais médios de defeitos maiores encontrados para os espermatozoides congelados nos diversos diluidores, as mesmas não foram significativas. Entretanto, levando-se em consideração apenas os valores numéricos, pode-se verificar que os diluidores TRIS+EQUEx+EDTA e TRIS+EQUEx obtiveram os menores percentuais de defeitos maiores e defeitos de acrossoma e, assim como o TRIS+EDTA, promoveram índices semelhantes ($P > 0,05$) de lesões acrossomais em relação ao sêmen fresco, o que pode sugerir a eficácia desses diluidores para a preservação da morfologia espermática durante o processo de congelação-descongelação. Já para os diluidores TRIS e Bioexcell[®] verificaram-se maiores ($P < 0,05$) índices de defeitos acrossomais quando comparados ao ejaculado fresco.

Discussão

A adição de EDTA ao diluidor não melhorou as taxas de motilidade espermática total, progressiva e vigor espermático pós-descongelação e após o TTR. Achados semelhantes ao deste estudo foram descritos por Aisen et al.²⁷ em ovinos, que não

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e vigor espermático no sêmen fresco, comparativamente aos cinco diluidores (TRIS, TRIS+EDTA, TRIS+EQUEX, TRIS+EDTA+EQUEX, Bioexcell), logo após a descongelação

TRATAMENTO	MT (Média ± S)	MP (Média ± S)	VIGOR (Média ± S)
Sêmen Fresco	61,00 ± 7,40 ^a	55,55 ± 7,26 ^a	3,94 ± 0,16 ^a
TRIS	38,75 ± 6,94 ^{bc}	34,37 ± 6,23 ^{bc}	3,31 ± 0,45 ^{ab}
TRIS+EDTA	35,71 ± 6,07 ^c	30,71 ± 6,07 ^c	2,92 ± 0,53 ^b
TRIS+EQUEX	44,37 ± 4,95 ^b	39,37 ± 4,95 ^b	3,64 ± 0,37 ^a
TRIS+EQUEX +EDTA	43,75 ± 6,40 ^b	39,37 ± 6,23 ^b	3,31 ± 0,53 ^{ab}
Bioexcell	27,14 ± 4,87 ^d	21,42 ± 6,23 ^d	2,14 ± 0,62 ^c

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05)

Tabela 2 - Médias e desvios-padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e vigor espermático nos cinco diluidores (TRIS, TRIS+EDTA, TRIS+EQUEX, TRIS+EDTA+EQUEX e Bioexcell), logo após o teste de termoresistência (TTR)

TRATAMENTO	MT (Média ± S)	MP (Média ± S)	VIGOR (Média ± S)
TRIS	35,62 ± 5,62 ^b	31,87 ± 5,93 ^b	3,08 ± 0,49 ^{bc}
TRIS+EDTA	33,57 ± 4,75 ^b	30,00 ± 5,00 ^b	2,71 ± 0,48 ^c
TRIS+EQUEX	43,75 ± 3,53 ^a	39,37 ± 4,95 ^a	3,81 ± 0,25 ^a
TRIS+EQUEX +EDTA	43,12 ± 7,03 ^a	38,12 ± 7,03 ^a	3,50 ± 0,46 ^{ab}
Bioexcell	25,71 ± 4,49 ^c	20,71 ± 4,49 ^c	1,92 ± 0,67 ^d

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

Tabela 3 - Médias de defeitos menores (DME), defeitos maiores (DM), defeitos de acrossoma (AC) e defeitos espermáticos totais (DT) do sêmen fresco, e após a descongelação nos cinco diluidores (TRIS, TRIS+EDTA, TRIS+EQUEX, TRIS+EQUEX+EDTA e Bioexcell)

TRATAMENTO	DME (Média ± S)	DM (Média ± S)	AC (Média ± S)	DT (Média ± S)
Sêmen Fresco	07,77 ± 3,53 ^{ab}	2,11 ± 1,38	0,05 ± 0,16 ^a	09,94 ± 4,33 ^a
TRIS	14,77 ± 8,99 ^b	5,77 ± 4,60	2,66 ± 2,82 ^b	20,55 ± 11,40 ^b
TRIS+EDTA	07,12 ± 5,02 ^{ab}	4,50 ± 2,67	1,25 ± 1,48 ^{ab}	10,37 ± 5,65 ^a
TRIS+EQUEX	08,44 ± 7,43 ^{ab}	2,44 ± 1,87	1,11 ± 1,36 ^{ab}	10,88 ± 8,35 ^a
TRIS+EQUEX+EDTA	05,50 ± 4,24 ^a	2,87 ± 2,53	0,37 ± 0,51 ^{ab}	08,37 ± 5,04 ^a
Bioexcell	10,37 ± 5,31 ^{ab}	4,25 ± 2,37	2,50 ± 2,50 ^b	14,12 ± 6,77 ^{ab}

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

encontraram diferença significativa para a motilidade espermática pós-descongelação entre o sêmen diluído com Tris-gema de ovo (58,5%), e o que continha 0,1% de EDTA associado ao diluidor (52,1%).

Apesar da semelhança (P>0,05) observada entre os índices de motilidade espermática total, motilidade progressiva e vigor espermático, foi verificado um melhor desempenho do diluidor TRIS+EDTA em relação ao TRIS (P<0,05), para o número de defeitos espermáticos totais (Tabela 3). O melhor índice de integridade da

morfologia espermática no diluidor com EDTA é justificado já que este, ao quelar o cálcio, minimiza a sua biodisponibilidade no meio extracelular, reduzindo o seu influxo e inibindo, assim, o desenvolvimento das lesões espermáticas provocadas por esse processo^{4,5}, altamente relacionado à diminuição da viabilidade e morte celular, durante a congelação². De forma contrária, mas utilizando o mesmo percentual de EDTA em diuidor Tris-gema de ovo, Bittencourt et al.⁶ observaram uma maior (P<0,05) taxa de caudas fortemente dobradas

(49,5% *versus* 26%) e de caudas com dobramento simples (64,5% *versus* 38,2%).

Essas divergências observadas na literatura científica, em relação a eficácia da utilização do EDTA para a criopreservação espermática, está relacionada a ocorrência de alguns fenômenos, e entre estes o principal seria o fator de interação entre os componentes do meio diluidor, uma vez que nem sempre a remoção do cálcio do meio extracelular é desejável. Este fato foi observado em estudo que, ao avaliar o efeito da associação EDTA e trealose²⁸, demonstrou que o diluidor com EDTA promoveu maiores índices de alterações da membrana espermática, bem como maiores níveis de peroxidação lipídica. Os autores concluíram que a ação antioxidante da trealose foi inibida pela retirada do cálcio do meio extracelular pelo EDTA, sugerindo a existência de um efeito positivo da interação entre a trealose e o cálcio, sobre a região polar dos fosfolípidios da membrana espermática. No entanto, no presente estudo, a remoção do cálcio do meio extracelular promoveu efeito desejável sobre os espermatozoides, comprovado pelo menor índice ($P < 0,05$) de defeitos espermáticos totais no sêmen congelado com o diluidor TRIS+EDTA (Tabela 3).

Apesar da inexistência de relatos da utilização do Equex STM em diluidores para a criopreservação do sêmen caprino, os resultados obtidos neste experimento com os grupos que continham esse detergente, confirmam estudos anteriores realizados com outras espécies, que demonstraram o seu efeito positivo para a manutenção dos bons parâmetros espermáticos pós-descongelamento.^{7,8,9,10} Os melhores índices de motilidade total e progressiva, verificados para os diluidores contendo Equex STM após o TTR, corroboram com os resultados citados por Peña e Linde-Forsberg⁸ e Rota et al.¹⁰, que comparando o efeito da adição do Equex ao diluidor de sêmen canino, obtiveram melhores índices de sobrevivência após a descongelamento e o TTR. Maia et al.⁷ confirmaram estas observações, relatando taxas superiores ($P < 0,05$) de motilidade

progressiva no diluidor de sêmen ovino com o Equex STM (39% *versus* 24%). Esses achados podem ser explicados pois, o detergente dodecil-sulfato de sódio (DDS) que é a substância ativa do Equex STM Pastetem, como função primordial, aumentar a disponibilidade dos fosfolípidios da gema de ovo, melhorando a sua capacidade de proteção à membrana plasmática dos espermatozoides contra o choque térmico, minimizando o surgimento das alterações promovidas pelo processo de criopreservação.¹⁰ Este efeito é confirmado pelo fato que os diluidores com Equex em sua composição, além das melhores taxas de motilidade espermática, apresentaram os menores percentuais numéricos de defeitos maiores, menores, de acrosoma e defeitos totais, em relação a todos os outros diluidores estudados (Tabela 3). Os baixos índices de viabilidade espermática obtidos neste trabalho com o diluidor Bioexcell discordam dos resultados satisfatórios relatados em trabalhos que utilizaram esse diluidor, ou outro a base de lecitina de soja, para criopreservação do sêmen de ovinos^{20,22} e bovinos^{21,29}. Gil et al.²², utilizando o Bioexcell® em ovinos, encontraram médias de motilidade espermática pós-descongelamento de 56%, valor semelhante ($P > 0,05$) aos 58% verificados para o diluidor a base de leite-gema de ovo testado pelos autores e superior aos 27,14 % encontrados neste experimento com Bioexcell. Resultados semelhantes foram relatados pela mesma equipe de pesquisa em outro estudo.²⁰ Contudo, em ambos os trabalhos foi utilizada a metodologia rotineiramente empregada na Suécia com a diluição do sêmen em duas etapas, adicionando a fração do diluidor com glicerol somente após o resfriamento do sêmen a temperatura de 5°C, tanto para o diluidor Bioexcell quanto para o leite-gema de ovo. No presente estudo, para todos os grupos experimentais foi utilizado o método de diluição em uma etapa, já com a concentração final de glicerol, inclusive para o Bioexcell, já que esta é a forma na qual é feita a sua comercialização no Brasil. Esse fato sugere que melhores

resultados com a utilização do Bioexcell para a congelação do sêmen caprino poderiam ser obtidos empregando-se a diluição em duas etapas.

A partir das avaliações *in vitro*, pode-se concluir que a adição do Equex STM Paste ao diluidor Tris-gema de ovo promove uma maior manutenção da viabilidade dos espermatozoides de caprinos pós-descongelação, quando comparado com os diluidores que não o contêm. Da mesma forma, o EDTA mostra-se eficaz na preservação da morfologia espermática pós-descongelação. No entanto, estudos de fertilidade *in vivo*, com a

incorporação desses componentes ao diluidor, devem ser realizados para efetiva comprovação de sua eficácia na congelação do sêmen caprino. O diluidor comercial Bioexcell foi ineficaz, sugerindo-se a realização de novos estudos para avaliar o efeito do método de diluição (uma ou duas etapas) sobre a congelabilidade dos espermatozoides caprinos.

Agradecimentos

Esse trabalho foi desenvolvido com o apóio financeiro da CAPES e da FAPESB e patrocínio do laboratório Tecnopec.

Effects of a calcium chelator, a detergent and the soybean lecithin on the quality of the frozen-thawed goat semen

Abstract

The aim of this paper was verifying the effect of the Equex STM Paste and EDTA addition to a Tris-egg yolk extender, on the post-thaw goat sperm viability. Nine semen samples of two adult goats were collected by artificial vagina and cryopreserved. It was also objective of this study, to evaluate the utilization of a soybean lecithin based commercial extender (Bioexcell® - IMV, L'Aigle, French) for the goat semen freezing. They were formed five experimental groups: TRIS; TRIS+EDTA; TRIS+EQUEX; TRIS+EDTA+EQUEX e Bioexcell. After evaluation, the semen was diluted in the five extenders and packed in 0.25mL straws with 100 million of motile spermatozoa. The samples were cooled at 0,46°C/min to 5°C, submitted at 75min of equilibration time and frozen in liquid nitrogen vapour. The thawing was accomplished in 37°C water bath for 50s. There were no differences ($P>0,05$) on the means of post-thaw total and progressive sperm motility among the groups TRIS, TRIS+EQUEX and TRIS+EQUEX+EDTA. The Bioexcell group obtained the least ($P<0,05$) percentage of post-thawing total and progressive sperm motility. After the thermotolerance test, it was observed the greatest ($P<0,05$) rates of total and progressive sperm motility in the Equex STM groups (TRIS+EQUEX and TRIS+EQUEX+EDTA). Thus, it can be affirmed that the Equex addition promotes better maintenance rates in the pos-thaw sperm viability, when compared with the extenders that did not contain it.

Key word:

Goat.
Semen.
Cryopreservation.
Extender.

Referências

- 1 WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 482-492, 2000.
- 2 AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-174, 1987.
- 3 MARTIN, J. C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and storage in large volumes straws. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 27, p. 47-51, 1979.
- 4 WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm

- cell membranes. In: MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Ed.) **Effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981. p. 189.
- 5 DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L. S. O. Effect of extenders, additives and deep freezing on the leakage of lactic dehydrogenase from cattle and buffalo spermatozoa. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 63, n. 3, p. 251-256, 1993.
- 6 BITTENCOURT, R. F. et al. Utilização de glicerol ou etilenoglicol como crioprotetores na congelação de sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004.
- 7 MAIA, M. S. et al. Efeito da adição do Equex-STM ao diluente Tris-gema na motilidade do espermatozoide criopreservado de carneiro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 311, 2005. Suplemento 1.
- 8 PEÑA, A.; LINDE FORSBERG, C. Effects of equex, one or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 859-875, 2000.
- 9 PEÑA, A. et al. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca^{2+} concentration of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59, n. 8, p. 1725-1739, 2003.
- 10 ROTA, A. et al. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 °C. **Theriogenology**, v. 47, p. 1093-1101, 1997.
- 11 DORADO, J.; RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 168-177, 2007.
- 12 LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000.
- 13 DAS, K. K.; RAJKONWAR, C. K. Acrosomal changes of buck spermatozoa after equilibration and freezing in egg yolk citrate glycerol extender. **Indian Veterinary Journal**, v. 73, n. 1, p. 35-40, 1996.
- 14 SINGH, L. P.; PURBEY, L. N. Effect of ultra-low temperature on acrosomal integrity of buck spermatozoa in Tris and citrate dilutors. **Indian Journal of Animal Reproduction**, v. 17, n. 1, p. 45-49, 1996.
- 15 SINGH, L. P.; PURBEY, L. N. Preservability of goat spermatozoa in Tris and citrate extenders at -196°C and 5°C. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 66, n. 11, p. 1139-1141, 1996.
- 16 DESHPANDE, S. B.; MEHTA, V. M. Effect of dilutors and different glycerol levels on pre-freeze and post-freeze sperm motility and live sperm count in Suri buck semen. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 61, n. 10, p. 1093-1095, 1991.
- 17 ARAÚJO, A. A. de; NUNES, J. F. Utilização da água de côco *in natura* com adição de ovo como diluidor de congelamento de sêmen caprino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1991, v. 2, p. 435.
- 18 PETERSON, K. et al. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 863-887, 2007.
- 19 BOUSSEAU, S. et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. **Theriogenology**, v. 50, p. 699-706, 1998.
- 20 GIL, J. et al. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v. 59, n. 5-6, p. 1157-1170, 2003.
- 21 GIL, J. et al. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos Plus® and Triladyl®. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, p. 69-77, 2000.
- 22 GIL, J. et al. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v. 59, n. 5-6, p. 1241-1255, 2003.
- 23 ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology)**. 3. ed. Michigan: Edwards Brothers, 1986. 981 p.
- 24 HENRY, M.; NEVES, J. P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49 p.
- 25 SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 1998. 221 p.
- 26 SAS. **User's guide: statistics**, version 5. Cary: SAS Institute, 1996. 956 p.
- 27 AISEN, E. G. et al. Effect of trehalose and edta on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, v. 53, p. 1053-1061, 2000.
- 28 AISEN, E. G. et al. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v. 50, n. 3, p. 239-249, 2005.
- 29 VAN WAGTENDONK DE LEEW, A. M. et al. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy-bean extract. **Theriogenology**, v. 54, p. 57-67, 2000.